



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12P 7/24 // (C12P 7/24, C12R 1:465)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/34971 (43) Date de publication internationale: 7 novembre 1996 (07.11.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00672 (22) Date de dépôt international: 3 mai 1996 (03.05.96)		(81) Etats désignés: CA, CN, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 95/05395 5 mai 1995 (05.05.95) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec une indication relative à un micro-organisme déposé, fournie selon la règle 13 bis, séparément, et non pas avec la description.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.</i> <i>Date de réception par le bureau international:</i> 17 juin 1996 (17.06.96)	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ORSAN [FR/FR]; Z.A. Courtabœuf 1, 16, avenue de la Baltique, F-91940 Les Ulis (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDRAS, Blandine [FR/FR]; Place de la Mairie, F-80300 Bresle (FR). MORE, Jöelle [FR/FR]; 49, avenue d'Etampes, F-91410 Dourdan (FR). (74) Mandataires: MARTIN, J., J. etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING VANILLIN USING THE BIOCONVERSION OF BENZENE PRECURSORS

(54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION DE VANILLINE PAR BIOCONVERSION DE PRECURSEURS BENZENIQUES

(57) Abstract

Method for producing vanillin using the bioconversion of benzene precursors of vanillin, particularly ferulic acid or sodium ferulate, characterised in that an immobilised culture of Actinomycetes micro-organisms, for example of the *Streptomyces* genus, is provided in a medium to which the benzene precursor of vanillin has been added and which further contains an organic phosphate, and the vanillin resulting from the bioconversion of said precursor is recovered, the *Streptomyces* strain being selected for its metabolic capacity to store vanillin in the medium from the benzene precursor-containing medium.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de production de vanilline par bioconversion de précurseurs benzéniques de la vanilline, en particulier l'acide férulique ou le férulate de sodium, caractérisé par le fait qu'on effectue une culture immobilisée de microorganismes Actinomycètes, notamment du genre *Streptomyces* dans un milieu dans lequel le précurseur benzénique de la vanilline a été ajouté, ce milieu comprenant, en outre, un phosphate organique, et on récupère la vanilline produite après bioconversion dudit précurseur, la souche de *Streptomyces* étant sélectionnée pour sa propriété métabolique d'accumuler de la vanilline dans le milieu à partir du milieu contenant le précurseur benzénique de la vanilline.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LR	Libéria	SZ	Swaziland
CN	Chine	LT	Lituanie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
EE	Estonie	MG	Madagascar	UG	Ouganda
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France	MR	Mauritanie	VN	Viet Nam

PROCEDE DE PRODUCTION DE VANILLINE PAR BIOCONVERSION DE PRECURSEURS BENZENIQUES

L'invention concerne un procédé de production de vanilline à 5 partir de précurseurs benzéniques par bioconversion.

Il est déjà connu de produire de la vanilline par voie microbienne. A titre d'exemple, le brevet EP 0 405 197 décrit un procédé de production de vanilline par fermentation microbienne d'eugénol ou d'isoeugénol. Pour cela, un microorganisme libre de l'espèce *Serratia*, 10 *Enterobacter* ou *Klebsiella* est mis en oeuvre dans un milieu comprenant notamment une source de carbone ainsi que, le cas échéant, différents sels inorganiques, des organo-éléments et des vitamines.

Cependant, ce procédé présente certains inconvénients. D'une part, l'eugénol et l'isoeugénol sont des substrats difficiles à manipuler 15 puisqu'ils sont hydrophobes et, d'autre part, l'utilisation d'un milieu complexe n'est pas souhaitable, tant au niveau de la préparation que de l'isolement de la vanilline. Enfin, le rendement de ce procédé est faible, de l'ordre de 20 %.

Le brevet EP 0 453 368 décrit un procédé de production de la 20 vanilline par bioconversion de précurseurs benzéniques. Selon ce procédé, on met en oeuvre un champignon Basidiomycète qui est d'abord cultivé en milieu liquide et, après trois jours de culture, le substrat de bioconversion est ajouté dans le milieu de culture. Le substrat de bioconversion est un dérivé du benzène tel que l'acide férulique ou l'isoeugénol. Le 25 microorganisme est libre dans le milieu de culture.

Ce procédé présente un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, l'utilisation de fungi n'est pas très commode, ensuite il serait préférable de pouvoir mettre en contact le milieu de culture et le substrat de bioconversion plus rapidement et, enfin, il serait souhaitable d'améliorer le 30 rendement du procédé qui est, là encore, d'environ 20 %.

A cet égard, on peut remarquer que lorsque le substrat utilisé est particulièrement coûteux, il est important que le procédé présente un rendement maximum.

Le brevet US 5 128 253 décrit un procédé de production de 35 vanilline par conversion microbienne d'un substrat choisi dans le groupe comprenant notamment l'acide férulique, l'eugénol ou les dérivés conifériques, au moyen d'un microorganisme libre appartenant à

l'espèce *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Rhodotorula glutinis* et *Aspergillus niger*. La conversion est effectuée en présence d'un dérivé de type sulfhydryle et, le cas échéant, en présence d'une source de carbone.

5 Là encore, le milieu de bioconversion est complexe et le rendement du procédé est de 20 % environ.

Le but de l'invention est de fournir un procédé de production de vanilline présentant notamment les avantages suivants :

- la vanilline préparée est obtenue par bioconversion, cette bioconversion peut être réalisée à partir de substrats naturels sans mettre en jeu d'additifs ou de réactifs synthétiques ;
- le procédé doit être simple à industrialiser, le milieu de bioconversion doit être un milieu défini (sans produits biologiques complexes comme les extraits de levures) et simple et la vanilline obtenue doit être facile à extraire du milieu de bioconversion ;
- 15 - le procédé doit être rentable : le rendement de production par rapport au précurseur doit être amélioré par rapport à celui obtenu selon la technique antérieure, et le procédé doit pouvoir fonctionner suffisamment longtemps avec le même système de bioconversion.

20 Pour ce faire, la présente invention a pour objet un procédé de production de vanilline par bioconversion de précurseurs benzéniques de la vanilline, en particulier l'acide férulique ou le férulate de sodium, caractérisé par le fait qu'on utilise une culture immobilisée de microorganismes Actinomycètes, notamment du genre *Streptomyces*, dans un milieu défini dans lequel le précurseur benzénique de la vanilline a été ajouté, ce milieu comprenant, en outre, un phosphate organique, et on récupère la vanilline produite par bioconversion dudit précurseur, la souche de *Streptomyces* étant sélectionnée pour sa propriété d'accumuler de la vanilline dans le milieu à partir du milieu contenant le précurseur benzénique de la vanilline.

30 Le procédé selon l'invention met en oeuvre un microorganisme immobilisé. Cette immobilisation donne lieu à une production de vanilline beaucoup plus importante, plus reproductible, pouvant se réaliser sur de plus longues durées que lorsque le microorganisme est libre dans le milieu de bioconversion. En d'autres termes, elle confère au système une meilleure stabilité.

Les bactéries selon la présente invention sont utilisées sous forme immobilisée, c'est-à-dire encapsulées dans une matrice appropriée comme cela est connu de l'homme du métier.

Toutefois, on préférera utiliser des microparticules contenant les microorganismes et, bien que ces particules puissent être en polymère synthétique, on préférera utiliser des polymères tels que les alginates, la gélatine ou d'autres produits du même type, les alginates étant très largement préférés. La technologie de préparation des billes ou particules d'alginate contenant des microorganismes par réticulation avec Ca^{2+} est connue.

On désignera par "procédé de bioconversion" un procédé dans lequel il n'y a pratiquement pas de croissance de la masse bactérienne et où les éléments du milieu sont essentiellement destinés à assurer la conversion enzymatique du substrat en vanilline.

Le milieu dit "défini" est un milieu qui ne contient pas de mélanges de protéines complexes tels que les extraits de levures ou des peptones, lesquelles jouent un rôle dans la croissance bactérienne, ce milieu n'autorisant de préférence pas la croissance des microorganismes.

Parmi les précurseurs de la vanilline, il faut citer en particulier l'acide férulique et ses sels, notamment de sodium, mais d'autres précurseurs benzéniques sont possibles, notamment l'eugénol, l'isoeugénol et l'alcool conyférilique, même si leurs propriétés ne sont pas toujours compatibles avec une bonne bioconversion.

On peut également prévoir la production *in situ* des précurseurs à partir de sources naturelles, lesquels pourront être dégradés en dérivés de type férulique par des systèmes enzymatiques.

Les sources naturelles de ces produits sont assez abondantes, notamment dans de nombreux sous-produits de l'industrie sucrière, tels que les cossettes de betteraves mais aussi des sons de blé ou de riz.

Le milieu de bioconversion contiendra, en outre, des éléments assurant l'activité du système enzymatique et le maintien de cette activité, ainsi il est nécessaire de prévoir la présence de certains éléments tels que le magnésium, qui intervient parfois dans l'activité de synthèse enzymatique, ou d'autres sels tels que NaCl, ou, éventuellement des éléments permettant de modifier le pH ou la pression osmotique.

L'élément clé du milieu de bioconversion est le phosphate organique.

A titre de phosphate organique, on utilisera avantageusement l'un de ceux choisis dans le groupe comprenant les nucléotides, naturels ou non, ou les polyols phosphates tels que le glycérophosphate, particulièrement le glycérophosphate de calcium.

De préférence, le phosphate organique est le glycéro-phosphate.

En tant que nucléotide, on pourra utiliser l'inosine monophosphate, la guanosine monophosphate, l'uridine monophosphate ou la cytidine monophosphate.

Les autres polyols phosphates ont en général un prix prohibitif.

Des essais réalisés avec des phosphates minéraux ont montré que ceux-ci ont, en particulier sur l'immobilisation des microorganismes, notamment sur la matrice d'encapsulation, des effets néfastes.

En effet, on observe dans certains cas, notamment lorsque la matrice est un alginate, une désagrégation partielle ou totale de la matrice ou un relâchement de ce milieu limitant ainsi la durée de vie du système. De plus, dans certains cas, on peut observer avec certains nucléotides une croissance cellulaire dans le milieu avec formation de micropellets, ce qui peut diminuer les performances du système. Il s'ensuit qu'on préférera utiliser, en tant que phosphate organique, le glycérophosphate.

Selon un mode de mise en oeuvre préférentiel du procédé selon l'invention, les microorganismes sont de l'espèce *Streptomyces setonii*, en particulier les souches *Streptomyces setonii* CNCM n° I-1555 ainsi que ses mutants ayant la capacité à convertir les précurseurs de la vanilline en vanilline, notamment ceux pouvant être obtenus par mutation/sélection à partir de ladite souche, cette souche est notamment décrite par Sutherland, Crawford et Pometto; Can. J. Microbiol. vol. 29, 1983.

Ces microorganismes sont, de préférence, immobilisés dans des billes d'alginate, ces dernières étant réalisées en laissant tomber, goutte à goutte, les bactéries incorporées dans l'alginate de sodium liquide dans du

chlorure de calcium (0,1 M) sous agitation, qui assure la réticulation de la matrice incorporant les bactéries. On peut également prévoir l'utilisation d'une matrice à cœur liquide contenant les bactéries ou d'autres modes de mise en oeuvre.

5 On pourra également réaliser des billes comprenant une ou deux couches afin d'éviter l'échappement des bactéries.

Selon un autre mode de réalisation préférentiel du procédé selon l'invention, le milieu est maintenu à un pH compris entre 5 et 7,5 et, de préférence, voisin de 6,2 à 6,4 ; la température est avantageusement comprise entre 30 et 50°C et, de préférence, voisine de 45°C.

Le milieu contient, de préférence, du chlorure de sodium et du sulfate de magnésium et le phosphate organique est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 4 et 10 g/l et de préférence entre 7 et 8 g/l.

15 Le procédé peut être mis en oeuvre par "batch", en continu ou en semi-continu. Avantageusement, on apporte le précurseur et on récupère la vanilline séquentiellement ou en continu.

Dans le cas d'une bioconversion par "batch", l'ensemble du milieu est extrait en fin de conversion.

20 En continu ou en semi-continu, on extrait la vanilline au fur et à mesure de sa production ou à des temps déterminés, puis on recycle le milieu après ajout éventuel d'éléments complémentaires.

A ce sujet, un intérêt de ce procédé réside dans le fait que la vanilline formée demeure dans le milieu jusqu'à la consommation pratiquement totale du précurseur. Ce n'est qu'ensuite qu'elle se dégrade en acide vanillique.

30 En d'autres termes, ce procédé donne pratiquement lieu à deux étapes distinctes dans le temps de formation et de dégradation de la vanilline. Ceci a pour effet de faciliter l'opération d'extraction et d'assurer un rendement industriellement intéressant.

On pourra récupérer, de préférence, la vanilline lorsque le précurseur n'est plus détectable dans le milieu et avant la bioconversion de la vanilline en acide vanillique.

35 La vanilline est récupérée, par exemple, par extraction liquide/liquide. Le solvant peut être l'éther, l'acétate d'éthyle ou le toluène.

De préférence, le milieu comprend, en outre, un sel de magnésium.

Avantageusement, on utilise des souches de *Streptomyces setonii* CNCM n° I-1555 dans un milieu comprenant du glycérophosphate à 5 une concentration de 7,4 g/l, le pH du milieu étant de 6,4 et la température de 45°C.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre.

La description fait référence aux figures 1 à 3.

10 La figure 1 représente les résultats de bioconversion en fiole de férulate de sodium en vanilline en milieu comprenant de l'UMP.

La figure 2 représente les résultats de bioconversion en fiole d'acide férulique en vanilline dans un milieu comprenant du glycéro-phosphate.

15 La figure 3 représente les résultats de bioconversion d'acide férulique en vanilline en milieu comprenant du glycérophosphate, la bioconversion étant cependant réalisée en "batchs" successifs.

Les symboles et abréviations utilisés sont les suivants :

X : précurseur (acide férulique ou férulate de sodium)

20 ◊ : vanilline

O : acide vanillique

af : acide férulique

Fna: férulate de sodium

van: vanilline

25 av : acide vanillique

I - PROTOCOLE DE BIOCONVERSION

1 - Principe

On réalise deux types d'essais : en fiole ou en "batch".

Pour les essais en fiole, la bioconversion est réalisée à partir de 30 férulate de sodium en milieu comprenant de l'uridine monophosphate (UMP), et à partir d'acide férulique en milieu comprenant du glycéro-phosphate.

Pour les essais en "batch", la bioconversion est réalisée à partir d'acide férulique en milieu comprenant du glycérophosphate.

Les performances du procédé sont mesurées par un suivi dans le temps des concentrations en précurseur et en vanilline.

2 - Souche utilisée

On utilise un microorganisme de l'espèce *Streptomyces setonii* déposé à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM), 25 rue du Docteur-Roux - 75015 Paris, sous le n° I-1555 dépôt du 21 mars 1995.

3 - Essais

On prépare les milieux suivants :

Le milieu 1 comprend de l'UMP à une concentration de 12,95 g/l, NaCl 0,5 g/l, MgSO₄, 7H₂O 0,1 g/l, le pH est de 7,68.

Le milieu 2 comprend du glycérophosphate à une concentration de 7,4 g/l, NaCl 0,5 g/l, MgSO₄, 7H₂O 0,1 g/l, le pH est de 6,4.

On introduit dans 100 ml de milieux 1 et 2 10 ml de cellules en phase stationnaire (DO = 1,20) immobilisées dans 40 ml d'alginate. La concentration en billes d'alginate est de 140 billes pour 10 ml de mélange.

Dans le milieu 1, on introduit du férulate de sodium (2,22 g/l) comme précurseur de la vanilline, dans le milieu 2, de l'acide férulique (1,62 g/l).

Le milieu 3 est constitué de 1,25 l de milieu comportant du glycérophosphate à une concentration de 7,4 g/l, NaCl 0,5 g/l et MgSO₄, 7H₂O 0,1 g/l. On met en oeuvre 7 000 billes de microorganisme immobilisé et le précurseur utilisé est le férulate de sodium.

On effectue un suivi de la bioconversion en fonction du temps au moyen d'une analyse HPLC. Pour cela, on prélève 0,5 ml du milieu de culture, on filtre ce milieu, on le dilue dix fois et on l'analyse par HPLC.

Les figures 1 à 3 représentent les résultats de mesure des concentrations par HPLC en précurseur et en vanilline et en acide vanillique formés. Ces figures correspondent respectivement aux milieux 1 à 3.

a) Synthèse en fiole - milieux 1 et 2

A 45°C, on observe une consommation rapide du précurseur sur les deux figures. Cette consommation est quasi-totale pour le milieu à base d'UMP et avec le férulate de sodium comme précurseur (figure 1). Elle est totale pour le milieu à base de glycérophosphate avec l'acide férulique

comme précurseur (figure 2). Dans les deux cas, la synthèse de vanilline est détectée dès la deuxième journée et la quantité de vanilline accumulée est croissante quasiment jusqu'à consommation totale du précurseur.

Dans les deux cas, la concentration de la vanilline atteint environ 1 g/l, ce qui est une valeur élevée, et le rendement molaire maximal atteint environ 66 % en 90 heures, ce qui est également une valeur élevée. La concentration initiale en férulate de sodium est de 2,2 g/l.

Il apparaît enfin que les résultats obtenus en milieu comprenant du glycérophosphate et avec l'acide férulique comme précurseur sont particulièrement bons : la bioconversion dure seulement 3 jours, la concentration obtenue atteint 0,88 g/l et le rendement molaire maximal est de 69 %. La concentration initiale en acide férulique est de 1,62 g/l.

b) Essais par "batch" - milieu 3

On observe que le système mis en oeuvre peut fonctionner pendant environ 3 semaines, ce qui correspond à une durée de fonctionnement intéressante d'un point de vue industriel.

Pour tous les "batchs", on observe à 45°C une rapide diminution de la concentration en précurseur ; la disparition totale du précurseur correspond à une concentration maximale en vanilline.

Pour tous les "batchs" (sauf le premier pour lequel se produit l'amorce de la réaction) la concentration maximale en vanilline est élevée (comprise entre 0,65 et 0,9 g/l) et le rendement molaire de bioconversion est également élevé puisqu'il varie entre 53 et 69 %.

Il apparaît donc que la mise en oeuvre du procédé selon l'invention en "batchs" successifs est particulièrement intéressante puisque le système fonctionne longtemps et donne lieu à une production de vanilline avec un rendement élevé et une forte concentration.

REVENDICATIONS

1) Procédé de production de vanilline par bioconversion de précurseurs benzéniques de la vanilline, caractérisé par le fait que :

- 5 - on utilise une culture immobilisée de microorganismes Actinomycètes, notamment du genre *Streptomyces* dans un milieu défini dans lequel le précurseur benzénique de la vanilline a été ajouté, ce milieu comprenant, en outre, un phosphate organique, et
- 10 - après la bioconversion, on récupère la vanilline produite,
- 15 - la souche de *Streptomyces* étant sélectionnée pour sa propriété d'accumuler de la vanilline dans le milieu à partir du milieu contenant le précurseur benzénique de la vanilline.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le phosphate organique est choisi dans le groupe comprenant les polyols phosphates et les nucléotides naturels ou non.

15 3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé par le fait que le phosphate organique est le glycérophosphate.

20 4) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le microorganisme est de l'espèce *Streptomyces setonii*.

5) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les microorganismes sont immobilisés dans de l'alginate, de préférence dans des billes d'alginate.

25 6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le milieu est maintenu à un pH compris entre 5 et 7,5, de préférence voisin de 6,2 à 6,4, et à une température comprise entre 30 et 50°C et de préférence voisine de 45°C.

30 7) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le phosphate organique est présent dans le milieu à une concentration comprise entre 4 et 10 g/l, et de préférence entre 7 et 8 g/l.

8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'on apporte le précurseur et on récupère la vanilline séquentiellement ou en continu.

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on récupère la vanilline lorsque le précurseur n'est plus détectable dans le milieu et avant la bioconversion de la vanilline en acide vanillique.

5 10) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'on utilise des souches de *Streptomyces setonii* CNCM n° I-1555 dans un milieu comprenant du glycérophosphate à une concentration de 7,4 g/l, le pH du milieu étant de 6,4 et la température de 45°C.

10 11) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le milieu comprend, en outre, un sel de magnésium.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00672

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12P7/24 // (C12P7/24, C12R1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 23, 5 December 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 191344, SUTHERLAND, JOHN B. ET AL: "Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by Streptomyces setonii" XP002011686 see abstract & CAN. J. MICROBIOL. (1983), 29(10), 1253-7 CODEN: CJMIAZ; ISSN: 0008-4166, ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1,4,10

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

1 Date of the actual completion of the international search

27 August 1996

Date of mailing of the international search report

03.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Delanghe, L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 96/00672

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 13, 27 March 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 110637k, RAMACHANDRA, MURALIDHARA ET AL.: "Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete Streptomyces viridosporus" page 314; XP002011687 see abstract & APPL. ENVIRON. MICROBIOL., vol. 54, no. 12, 1988, pages 3057-3063, ---	1
A	EP,A,0 405 197 (HAARMANN & REIMER GMBH) 2 January 1991 cited in the application see claims ---	1
A	EP,A,0 453 368 (PERNOD RICARD) 23 October 1991 cited in the application see claims ---	1
A	US,A,5 128 253 (LABUDA IVICA M ET AL) 7 July 1992 cited in the application see claims -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PL/FR 96/00672

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0405197	02-01-91	DE-A-	3920039	03-01-91
		DE-D-	59002803	28-10-93
		JP-A-	3030683	08-02-91
		US-A-	5017388	21-05-91
EP-A-0453368	23-10-91	FR-A-	2661189	25-10-91
		AT-T-	140978	15-08-96
		JP-A-	7087987	04-04-95
		US-A-	5262315	16-11-93
US-A-5128253	07-07-92	CA-A-	2069361	01-12-92
		JP-A-	5244965	24-09-93
		US-A-	5279950	18-01-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No
PCT/FR 96/00672

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12P7/24 // (C12P7/24, C12R1:465)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 99, no. 23, 5 Décembre 1983 Columbus, Ohio, US; abstract no. 191344, SUTHERLAND, JOHN B. ET AL: "Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by Streptomyces setonii" XP002011686 voir abrégé & CAN. J. MICROBIOL. (1983), 29(10), 1253-7 CODEN: CJMIAZ; ISSN: 0008-4166, ---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1,4,10

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée
27 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
03.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Delanghe, L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der: **PCT/FR 96/00672**
Re: **Internationale No**

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 13, 27 Mars 1989 Columbus, Ohio, US; abstract no. 110637k, RAMACHANDRA, MURALIDHARA ET AL.: "Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete Streptomyces viridosporus" page 314; XP002011687 voir abrégé & APPL. ENVIRON. MICROBIOL., vol. 54, no. 12, 1988, pages 3057-3063,	1
A	EP,A,0 405 197 (HAARMANN & REIMER GMBH) 2 Janvier 1991 cité dans la demande voir revendications	1
A	EP,A,0 453 368 (PERNOD RICARD) 23 Octobre 1991 cité dans la demande voir revendications	1
A	US,A,5 128 253 (LABUDA IVICA M ET AL) 7 Juillet 1992 cité dans la demande voir revendications	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PC / FR 96/00672

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0405197	02-01-91	DE-A- 3920039 DE-D- 59002803 JP-A- 3030683 US-A- 5017388	03-01-91 28-10-93 08-02-91 21-05-91
EP-A-0453368	23-10-91	FR-A- 2661189 AT-T- 140978 JP-A- 7087987 US-A- 5262315	25-10-91 15-08-96 04-04-95 16-11-93
US-A-5128253	07-07-92	CA-A- 2069361 JP-A- 5244965 US-A- 5279950	01-12-92 24-09-93 18-01-94